

Japan Patent Office (JP)

LS #24

## Public Report of Opening of the Patent

Opening No. of patent: H 8-267

Date of publication: Jan. 9, 1996

Int.Cl.	Distinguishing No.	Adjustment No. in Office	F1
C 12 N 11/04			
11/08	C		

examination: pending

Request for

claim requested: 10 OL

Number of

Application of the patent: No. H 6-141571

Date of application: June 23, 1994

Applicant: K. K. Nippon Shokubai

1-1, 4-chome, Koraibashi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka

Inventor: Hisashi Senba

K. K. Nippon Shokubai, Tsukba Research Center, 25-12, 1-chome, Kannondai,  
Tsukuba-shi, Ibaragi

Inventor: Koichi Sakano

K. K. Nippon Shokubai, Tsukba Research Center, 25-12, 1-chome, Kannondai,  
Tsukuba-shi, Ibaragi

Assigned representative: Takashi Ishida, patent attorney (and 2 others)

## Detailed Report

(Name of invention)

Immobilized biocatalyst

Abstract

(Constitution)

This invention offers an immobilized biocatalyst which has the following characteristics. A mixed solution which contains at least one monomer selected from acrylic acid and methacrylic acid and their salts and cells and/or enzyme is dispersed in a solvent that is either nearly insoluble or insoluble in water. After that, it is polymerized, and if desired, dried.

(Effects of the invention)

It is possible to immobilize a large number of cells and enzyme. At the same time, it can easily be turned into granules (spherical shape). The immobilized biocatalyst of this invention can be stored in a dry condition. When it is used, a water based medium, for example, a cultivation can be added. It can be used in the desired biochemical reaction.

Sphere of patent request

(Claim 1)

Claim 1 is concerning an immobilized biocatalyst which has the following characteristic. It is acquired by polymerizing a mixed solution (1), which contains at least one monomer (A) selected from a group consisting of acrylic acid and methacrylic acid and their salts, cells and/or enzyme, and water.

(Claim 2)

Claim 2 is concerning dried immobilized biocatalyst acquired by drying the immobilized biocatalyst in claim 1.

(Claim 3)

Claim 3 is concerning the immobilized biocatalyst in claim 1 or claim 2 where the mixed solution (1) in claim 1 contains a crosslinking agent.

(Claim 4)

Claim 4 is concerning the immobilized biocatalyst in claims 1 to 3 where the ratio of monomer (A) in claim 1 is in the range of 10 to 50 wt. % per mixed solution (1).

(Claim 5)

Claim 5 is concerning a manufacturing method for the immobilized biocatalyst which has the following characteristics. The solution (1) in claim 1 is suspended and dispersed in a solvent which is either nearly insoluble or insoluble in water and it is polymerized to form a spherical immobilized biocatalyst.

(Claim 6)

Claim 6 is concerning a manufacturing method for the immobilized biocatalyst which uses a suspension polymerization method stated in claim 5 which has the following characteristic. It uses solvent which is either nearly insoluble or insoluble in water where the ratio of the weight of solvent which is either nearly insoluble or insoluble in water and the weight of the mixed solution (1) is 1:0.9 to 1:1.1.

(Claim 7)

Claim 7 is concerning a manufacturing method for an immobilized biocatalyst which has the following characteristic. The mixed solution (1) in claim 1 is polymerized by suspending and dispersing it in solvent which is either nearly insoluble or insoluble in water where a dispersion stabilizer has been added.

(Claim 8)

Claim 8 is concerning the manufacturing method in claim 7 where the dispersion stabilizer is at least a nonionic surfactant and/or polyethylene glycol.

(Claim 9)

Claim 9 is concerning the manufacturing method in claim 7 where the dispersion stabilizer consists of inorganic particles.

(Claim 10)

Claim 10 is concerning a manufacturing method for an immobilized biocatalyst which has the following characteristic. That is, polymerization is done by adding alginate acid or its salt to the mixed solution (1) in claim 1 as an immobilizing assisting agent.

Detailed explanation of the invention

[0001]

(Technical field that this invention belongs to)

This invention is concerning an immobilized biocatalyst and also a manufacturing method for the same. It offers a new immobilized biocatalyst where cells and enzyme can be immobilized effectively in a water absorbing cross-linking polymer carrier and can be stored for a long period of time. This invention also includes a manufacturing method for the same.

[0002]

(Prior art)

Cell of an organism and enzyme are widely used in many fields such as manufacturing of various useful substances, analysis, water treatment, etc. Especially, immobilized cells or immobilized enzymes where cells and/or enzyme are immobilized in various insoluble carriers are suitable for improving reaction efficiency or simplifying separation and refining processes or simplification of re-using cells and/or enzyme. In this invention, the immobilized cells, immobilized enzymes, etc., are called immobilized biocatalysts.

[0003] Accordingly, if the immobilized biocatalyst can be stored dry for long periods of time at room temperature and can be reactivated by adding water, it is possible to store for long period of time or to transfer the immobilized biocatalyst in a light weight,

compact condition at low cost. In addition, since it is dry, fewer problems with contamination in storage are expected.

[0004] In the past, the immobilized biocatalyst had to be refrigerated in a buffer of isotonic sodium chloride solution. Although microorganisms or enzymes which can remain active when dried do exist, there are no known immobilized biocatalysts which can be dried for storage and used by immersing in water after the dry storage.

[0005] That is, the gel-like immobilized biocatalyst in the past should not be reconstituted by adding water. In addition, even if the inorganic carrier is dried, there will be no change in size of the carrier itself, its volume will not change. Furthermore, since the inorganic carrier has considerable weight, there is not enough advantage to drying it.

[0006]

(Problem that this invention tries to solve)

Current reports of the use of water absorbing resin for immobilized biocatalyst are different from the intention of inventors of this invention. However, there are several of these reports. However, all of these are methods use water absorbing resin and to immobilize the microorganisms. Therefore, they are basically different from the method suggested by the inventors of this invention in that polymerization is done after mixing a monomer which can form a water-absorbing polymer selected from acrylic acid, methacrylic acid, and their salts to immobilize cells and/or enzyme biocatalyst.

[0007] That is, with previous methods which immobilize the biocatalyst in a water absorbing resin, the bacillus does not enter the gel, and it is immobilized only on the surface. A bacillus which is immobilized in this way is freed easily by changes in the solvent concentration (cultivation or reaction solution). Meanwhile, the preparation method for immobilized catalyst suggested by the inventors of this invention, since cells and/or enzyme can be uniformly kept inside the gel, the number of cells and/or enzymes per unit carrier will be increased. Accordingly, for reactions which use an immobilized catalyst, this invention will result in a far superior reaction speed.

[0008] Immobilized biocatalysts which use polyacryl amide as the carrier are widely known. These show some water absorbency. However, in order to acquire the polyacryl amide gel, since acryl amide monomer is very toxic, there kinds of cells and enzymes which can be used are considerably limited. Meanwhile, the acrylic acid and methacrylic acid and their salts in this invention are not very toxic to cells organism and enzymes compared to acryl amide. Accordingly, a much wider variety of cells and enzymes can be used. In addition, immobilizing methods which use conventional water absorbing resin, there is no discussion of suitable storage methods for the immobilized substance. Therefore, the concept of dry-storage advocated here by inventors of this invention is a new idea.

[0009]

(Steps for solution)

The inventors of this invention made through research concerning preparation and use of an immobilized biocatalyst which is light and can be stored compactly. As a result, the followings findings were made. First, a monomer which is selected from acrylic acid and methacrylic acid and their salts with cells and/or enzymes is mixed with.

Polymerization is given, and a water-absorbing immobilized biocatalyst is acquired. This can be dehydrated easily, so dry storage is possible. After storage, it can be rehydrated and reactivated and used in various kinds of biochemical reactions such as substance exchange, drainage processing, etc. This invention was completed based on these findings.

[0010] In the following, this invention is going to be explained in detail. In the following explanations, the monomer which consists of at least of acrylic acid and methacrylic acid and their salts is expressed as monomer (A). A solution of monomer (A) and cells and/or enzymes in water is expressed as mixed solution (1).

[0011] The 1<sup>st</sup> example of this invention is a water-absorbent immobilized biocatalyst acquired by polymerizing at least one kind of monomer (A) which consists of acrylic acid and methacrylic acid and their salts and a mixed solution (1) which consists of cells and/or enzymes and water. A dried immobilized biocatalyst is acquired by drying the immobilized biocatalyst so in a manner suitable for long periods of storage.

[0012] The 2<sup>nd</sup> example of this invention is an effective preparation method for the immobilized biocatalyst. The above mixed solution (1) is polymerized by suspending and dispersing it in a solvent which is either nearly insoluble or insoluble in water to produce a spherical immobilized biocatalyst. In this method, the weight ratio of the mixed solution (1) is adjusted in the range of 1:0.9 to 1:1.1 and a dispersion stabilizer is added to the solvent.

[0013] Also, the 3<sup>rd</sup> example of this invention is another preparation method for immobilized biocatalyst which is different from the 2<sup>nd</sup> example above. It is a preparation method for immobilized biocatalyst which adds alginic acid or its salts to the mixed solution (1) above as an immobilizing assistance agent and polymerizes it. At least one kind of monomer (A) which consists of acrylic acid and methacrylic acid and their salts means either one or both of acrylic acid or methacrylic acid monomers or their salts. Salts of acrylic acid or methacrylic acid means acrylic acid or methacrylic acid bonded to cations such as sodium, potassium, or ammonium ions, etc.

[0014] These acids and salts can be used either alone or together. The amount of monomer (A) in mixed solution (1) can be chosen freely it is normally in the range of 10 to 50 wt. %. However, as the amount of monomer is increased, the heat required for the polymerization reaction is also increased. Therefore, 10 to 40 wt. % range is preferred since its influence on the activity of the cells and/or enzymes gets bigger. For instance, when a large number of cells or enzymes are immobilized, the concentration should be high. On the other hand, if the number of cells and/or enzymes to be immobilized is small, the amount should be low. Therefore, the concentration is adjusted in accordance with the application.

[0015] The mixed solution (1) may contain, together with monomer (A), at least one or more monomers selected from olefin based unsaturated carbonic acid which is different from monomer (A) which can form a copolymer with monomer (A), its salts, and amide compounds. This method is used when it is necessary to change the nature of the carrier of the immobilized biocatalyst. Olefin based unsaturated carbonic acid other than the monomer (A) and its salts and amide means an acid other than monomer (A) which has a double bond and a carboxyl group in the molecule, and its salts and amide compounds. Suitable acids other than monomer (A) include olefin based unsaturated monocarbonate and olefin based unsaturated polycarbonate. Examples of the olefin based unsaturated

monocarbonate include, for example, crotonic acid, isocrotonic acid, angelic acid, tiglic acid, senecio acid, or a mixture of these.

[0016] Suitable olefin based unsaturated polycarbonates include, for example, maleic acid, fumaric acid, itaconic acid, aconitic acid, teraconic acid, citraconic acid, mesaconic acid, glutaconic acid, or mixtures of these. Maleic acid, fumaric acid, and itaconic acid are preferable. In addition, salts of olefin based unsaturated carbonates other than the monomer (A) means these olefin based unsaturated carbonate ions bonded to cations such as sodium, potassium, or ammonium ions.

[0017] Suitable amide compounds of olefin based unsaturated carbonates include, for example; acryl amide, methacryl amide, etc. Acids, salts, and amide compounds of these can be used either alone or together. There is no specific restriction on the amount of the coexisting monomer as long as the amount of monomer (A) is in the range of 10 to 50 wt. % of mixed solution (1). However, since these coexisting monomers include ones that are strongly toxic to the cells and/or enzymes such as acryl amide, the coexisting monomers should be added in the range which will not influence the activity of the cells and/or enzymes.

[0018] Furthermore, the pH of mixed solution (1) should be adjusted in the range where the activity of cells or enzymes to be immobilized will not be lost. The pH can be adjusted toward the acid side using an inorganic acid such as sulfuric acid, hydrochloric acid, nitric acid, or an organic acid such as acetic acid, formic acid, propionic acid, olefin based unsaturated carbonic acid, etc. When it is adjusted to the alkali side, you can use sodium hydroxide, potassium hydroxide, ammonium, etc.

[0019] Any kind of cells and/or enzymes can be used in this invention as long as they can be immobilized by the methods in this invention. The cells are selected from animal cells, vegetable cells, or microorganisms. Animal cells include, for example, cells from normal animal tissues, for example, W138 cells originated from human embryos, Flow 2000 cells, human liver cells, human kidney cells, or cells from cancerous tissues of animals, for example, Hela cells from human uterine cervical cancer, MCF-7 cells from human breast cancer, HC 84C cells from human colon cancer, mouse melanoma M2R cells, etc.

[0020] Also, there are B cells hybridoma which produces specific antibodies by uniting B cells and bone marrow cells, T cells hybridoma which produces lymphokines by uniting T cells and bone marrow cells, etc. Suitable vegetable cells include, for example, callus cultivation cells that have been de-specialized such as *Catharanthus roseus*, *Coptis japonica*, *Panax ginseng*, *Platycodon grandiflorum*, hairy root, shoot tissues that have been re-specialized, root tissues, etc.

[0021] Suitable cells of microorganisms include eumycetes such as *Aspergillus* genus, *Mucor* genus, *Rhizopus* genus, *Penicillium* genus, *Saccharomyces* genus, *Candida* genus, *Schizosaccharomyces* genus; bacterium such as *Escherichia* genus, *Acetobacter* genus, *Pseudomonas* genus, *Arthrobacter* genus, *Methylococcus* genus, *Bacillus* genus, *Mycobacterium* genus, *Nocardia* genus, etc.

[0022] Suitable enzymes include processed substances acquired from processing tissues and/or animal cells, vegetable, microorganisms, cultivation liquid which is acquired from cultivating partially refined coarse enzymes, refined enzymes, its tissues and/or cells, etc. Examples of these include glucose oxydase, cellulase, protease, aspartase, lipase, peroxidase, etc.

[0023] When the above cells and/or enzymes are immobilized, the amount of cells and/or enzymes should not exceed 6 wt. % dry weight of in mixed solution (1).

[0024] When the amount of cells and/or enzymes is small, there will be no problems with immobilization. However, if the amount exceeds 6 wt. %, the number of cells and/or enzyme which cannot be immobilized is increased, and immobilizing efficiency may drop. In preparing mixed solution (1), the order in which the monomer (A) and cells and/or enzyme are added is not specifically restricted. For instance, the cells and/or enzymes can be mixed into a solution of monomer (A), monomer (A) can be mixed into a solution of cells and/or enzymes, or a solution of monomer (A) and a solution of cells and/or enzyme, etc. may be mixed. Any of these methods can be used to produce mixed solution (1). In order to acquire a water-absorbent immobilized biocatalyst by polymerizing a mixed solution (1), it is preferred to add a cross-linking agent, polymerization initiator, and/or polymerization promoting agent to the mixed solution (1).

[0025] As the above cross-linking agent, for example, there are ethylene glycol, diethylene glycol, triethylene glycol, propylene glycol, 1,4-butanediol, 1,5-pentanediol, 1,6-hexanediol, neopentyl glycol, trimethylolpropane, diacrylate or dimethacrylate of pentaerythritol, and triacrylate or trimethacrylate of pentaerythritol, tetraacrylate or tetramethacrylate of pentaerythritol, or N, N-methylenebisacrylamide, N, N-methylenebis methacrylamide, triallyl isocyanurate, etc. Among these, one or more kinds can be used.

[0026] As the polymerization initiator, for example, there are water soluble radical polymerization agents such as potassium persulfate, ammonium persulfate, sodium persulfate, etc. One or more of these can be used. It can be used with a redox based initiator which uses these and sulfite, L-ascorbic acid together. Although the addition of a polymerization promoting agent is not necessary, its use is preferred for smoother immobilization. This polymerization promoting agent may be, for example, N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine, ethylenediamine, etc.

[0027] In the following, suitable reaction conditions for each example of this invention are going to be explained in detail. First, the amount of cross-linking agent in this invention should be adjusted to the mol number of the monomer. If the amount of cross-linking agent is increased, the immobilized object becomes hard, and its water absorbing strength becomes low. On the other hand, if the ratio is low, the immobilized object is soft, and water absorbing strength becomes high. Accordingly, it is desired to adjust the amount of cross-linking agent in accordance with each application and the desired condition of the immobilized biocatalyst.

[0028] Usually, a cross-linking agent is added to the mixed solution (1) in 0.001 to 50 mol % ratio per mol number of monomer (A). If the amount of cross-linking agent is less than 0.001 mol %, the immobilized biocatalyst acquired is soft and it is tacky. Therefore, the immobilized biocatalysts will stick to each other, making them hard to use. On the other hand, if the amount exceeds 50 mol %, water absorbency of the immobilized biocatalyst will drop considerably.

[0029] Next, the composition of the polymerization promoting agent and polymerization initiator and their process conditions are going to be explained. Both the polymerization promoting agent and polymerization initiator can be polymerized after they are dissolved in the mixed solution (1). However, as will be explained later, they can be added after

they are suspended in solvent which is either nearly insoluble or insoluble in water using a mold for acquiring the immobilized substance.

[0030] The polymerization promoting agent can be added into mixed solution (1) in the range of 0.2 to 10 mol % per mol number of monomer (A). In any case, if the amount of polymerization promoting agent is less than 0.2 mol %, its effect is negligible. On the other hand, if it exceeds 10 mol %, its influence on the cells is too strong.

[0031] The appropriate amount of polymerization initiator is in the range of 0.005 to 1.0 mol % per mol number of monomer (A) in mixed solution (1). In any case, if it is less than 0.005 mol %, the polymerization reaction requires a long time. On the other hand, if it is more than 1.0 mol %, it will produce immobilized biocatalyst with low water absorbing feature. This is true in the case where mixed solution (1) flows into a mold for polymerization or when it is suspended in a solvent for polymerization.

[0032] Next, the polymerization reaction conditions are going to be explained. In order to perform polymerization smoothly, dissolved oxygen should be removed from the mixed solution (1) and also from the solvent which will be discussed layer as much as possible. Nitrogen gas is an effective method for excluding oxygen. Since heating from the polymerization reaction influences cell and/or enzyme activity, the process temperature should be as low as possible. However, if the cells and/or enzymes are very stable to heat, this is not necessary. Accordingly, the temperature at polymerization initiation should be in the range of 0 to 30°C. Furthermore, a range from 0 to 25°C is even more preferred.

[0033] Start and finish of polymerization can be determined by monitoring the temperature of the mixed solution (1) after adding the polymerization promoting agent and polymerization initiating agent. The temperature inside the suspension polymerization device can also be monitored. When polymerization starts, the temperature starts to go up. As time passes, the temperature rise stops, and the temperature starts to drop. The point where it starts to drop is determined to indicate the completion of polymerization. Therefore, the polymerization start temperature is controlled and heat is removed so that the peak temperature will not damage the activity of the cells and/or enzymes. Using this operation, it is possible to prepare an immobilized biocatalyst.

[0034] The immobilized biocatalyst acquired above can be used for biochemical reactions as it is. However, when the unreacted component has to be removed, it is possible to wash it with an appropriate buffer such as isotonic sodium chloride solution, water, etc., which will not influence the activity of the cells and/or enzymes. Meanwhile, when the immobilized biocatalyst is going to be stored, moisture is removed by conventional methods. For example, various methods such as reduced pressure drying, hot air drying, drying by desiccant, freeze drying, etc., can be used. When drying is complete, the volume and weight of the immobilized biocatalyst are greatly reduced. If it is collected and stored in a dry environment at room temperature or low temperature, it can be stored for long periods of time with limited space.

[0035] The immobilized biocatalyst acquired from this invention can be prepared in various shapes or sizes in accordance with each application. It is possible to prepare the immobilized biocatalyst by molding polymerization methods. Various sizes of spherical immobilized biocatalyst can be prepared by suspension polymerization, and various sizes of spherical immobilized biocatalyst can be prepared by dropping polymerization.



[0036] First, preparation of immobilized biocatalyst by molding polymerization is going to be explained. The mixed solution (1) prepared by the above method is put into a desired molding container. Next, a polymerization promoting agent and polymerization initiator are added in order, and polymerization is started. In addition, polymerization can be done by premixing the above solution (1) and polymerization promoting agent and polymerization initiator.

[0037] Since the immobilized biocatalyst acquired above takes the shape of the mold, it can be smashed or cut to reduce its size. The immobilized biocatalyst acquired by this method can be used for a biochemical reaction as it is. Meanwhile, it can be dried for storage by the above drying methods. It can also be dried after it is washed once. The immobilized biocatalyst which has been dried can be stored for a long period of time in a dry environment.

[0038] Next, preparation of immobilized biocatalyst in spherical shape by suspension polymerization is going to be discussed. The immobilized biocatalyst can be polymerized in spherical shape by dispersion and suspension of mixed solution (1) in a solvent which is either insoluble or nearly insoluble in water with relative weight close to the mixed solution (1), by dispersion and suspension of mixed solution (1) in a solvent which is either insoluble or nearly insoluble in water which includes a with a dispersion stabilizer instead of adjusting the relative weight of the solvent.

[0039] First, a polymerization method which disperses and suspends mixed solution (1) in a solvent which is either insoluble or nearly insoluble in water which also has a relative weight close to the relative weight of mixed solution (1) is going to be explained. When mixed solution (1) is suspended in the solvent, mixed solution (1) will be dispersed in the solvent as spherical liquid drops.

[0040] The solvent used in this invention may be, for example, hydrogen carbide based organic solvents such as decane, octane, heptane, hexane, cyclohexane, cyclopentane, methyl cyclopentane, methyl cyclohexane, pentane, ligroin; face acid based organic solvents such as oleic acid, linoleic acid, linolenic acid; aromatic group based organic solvents such as benzene, toluene; halogen based organic solvents such as carbon tetrachloride, chloroform, Freon, etc. It is possible to use one or more of these. A low boiling point solvent is more preferable considering removal of the solvent after polymerization.

[0041] Next, a polymerization method which relies on similar relative weights of the mixed solution (1) and that of the solvent is going to be explained. In order to stabilize the liquid drops dispersed in the mixed solution (1) in solvent, the relative weight of the solvent should be similar to the relative weight of the mixed solution (1). This can be accomplished by mixing multiple solvents.

[0042] That is, the relative weight of the solvent is adjusted so that ratio of relative weight of the solvent and relative weight of mixed solution (1) will be in the range of 1:0.9 to 1:1.1. If the difference in relative weight becomes high, the mixed solution (1) and solvent will be separated into layers, and the dispersion will be very unstable. This will make it hard to acquire an immobilized biocatalyst with uniform particle diameter. However, if the relative weight is adjusted, a stable dispersion system can be acquired and it is possible to produce an immobilized biocatalyst with an almost uniform particle diameter. The particle diameter is adjusted by stirring the suspension system.

Accordingly, the stirring speed and/or stirring method of the suspension system is adjusted in accordance with each application.

[0043] When a polymerization initiator and polymerization promoting agent are added to the suspension system acquired by the method above, polymerization is started. Of course, similar polymerization is possible when polymerization initiator and polymerization promoting agent are added to the mixed solution (1) and then suspended in solvent. The ratio of mixed solution (1) to solvent should normally be in the range of 10 to 50 volume %. More preferably, it is 30 to 50 volume %. If it is out of this range, dispersion becomes insufficient. This is not preferred since the immobilized biocatalyst in spherical shape is hard to acquire or production rates drop, etc.

[0044] As stated above, the progress of polymerization can be monitored by monitoring the temperature of the suspension system. The immobilized biocatalyst acquired by this method is collected using a mesh and/or sieve. When the immobilized biocatalyst is used as it is, the unnecessary solvent should be removed by washing. Next, a polymerization method which disperses and suspends the mixed solution (1) in solvent with a dispersion stabilizer instead of adjusting the relative weight of the solvent is going to be explained.

[0045] The suspension polymerization method above adjusts the relative weight of the solvent to match that of the mixed solution (1). However, if a dispersion stabilizer is added to the solvent, it is possible to adjust the immobilized biocatalyst in spherical shape without adjusting the relative weight of the solvent. The same solvents can be used in this method. The dispersion stabilizer used in this method is a substance which assists dispersion so that liquid drops of mixed solution (1) are stable. For example, there are nonionic surfactants, polyethylene glycol, and inorganic particles.

[0046] Suitable nonionic surfactants include, for example, polyoxyethylene alkyl ether, polyoxyethylene alkyl phenol ether, sorbitane fatty acid ester, polyoxyethylene sorbitane fatty acid ester, polyoxyethylene acryl ester, polyoxyethylene oxypropylene block copolymer, sucrose fatty acid ester, etc. Polyethylene glycol can have a wide range of molecular weights, but one in the range of 400 to 1,000,000 is preferred.

[0047] It is possible to use one more of these nonionic surfactants and polyethylene glycol. Although the amount of nonionic surfactant and/or polyethylene glycol differs depending on the type used, it should be 0.01 to 20 wt. % per mixed solution (1). The nonionic surfactant and/or polyethylene glycol should be added to the solvent.

[0048] Suitable inorganic particles include, for instance, silica, alumina, titanium dioxide, barium titanate, magnesium titanate, calcium titanate, strontium titanate, zinc oxide, etc. Among these, silica particles such as AEROSIL R-972, 974, 502, 805, 812 (manufactured by Nippon Aerosil) are favorable. In addition, one with a hydrophobic surface is even more preferred.

[0049] The amount of inorganic particles depends on the amount of mixed solution (1), the diameter of the dispersed liquid drops, and the amount of solvent. The inorganic particles should be added to the solvent before the polymerization operation. Once the inorganic particles are added to the reaction system, it is not usually necessary to add more. As one example, the amount of hydrophobic silica particles when 60 ml of mixed solution is polymerized in 200 ml of solvent is in the range of 0.05 to 1 % per the solvent.

[0050] After this, the operation is the same as the above suspension polymerization method. In the next method, the immobilized biocatalyst is prepared by adding alginate acid or its salts to the mixed solution (1) as an immobilizing assistance agent and

administering polymerization by dropping it into a polyhydric metal salt solution. This preparation method adds alginic acid or its salts to the mixed solution (1). The composition of mixed solution (1) is same as the above composition. The amount of alginic acid or its salts can be in the range of 0.01 to 10 wt. % concentration in the mixed solution (1).

[0051] When the mixed solution (1) and alginic acid or its salts are mixed, it is dropped down to a solution which contains a polyhydric metal salt. The polyhydric metal salt used here may be, for example, one which contains calcium ions, magnesium ions, strontium ions, barium ions, copper ions, iron ions, aluminum ions, etc., as polyhydric metal ions. More specific examples include calcium chloride, magnesium chloride, calcium acetate, magnesium acetate, strontium chloride, copper chloride, magnesium citrate, iron chloride, aluminum chloride, etc. The polyhydric metal salt should make up 1 to 5 wt. % of the solution.

[0052] At this point, the polymerization promoting agent and polymerization initiator can be dropped later after mixing the mixed solution (1) which contains alginic acid or alginic acid salt. In addition, it can be added to the polyhydric metal salt solution beforehand. When the mixed solution (1) which contains alginic acid or alginic acid salt is dropped down to the polyhydric metal salt solution, a gel reaction happens instantly. This is a well-known phenomenon that is due to cross-linking of the alginic acid by the polyhydric metal salt.

[0053] At this point, since polymerization of polymer (A) has not started yet, it is left while stirring gently for 15 minutes to 1 hour. By this operation, polymerization of monomer (A) is completed, and a flexible and solid immobilized biocatalyst is prepared. The immobilized biocatalyst which has been prepared in this way will show no collapsing of gel even in a phosphoric acid solution which usually easily dissolves alginic acid gel, and it can be stored stably.

[0054] Accordingly, the new immobilized cells and enzyme (immobilized biocatalyst) in this invention can be manufactured easily and quickly, and it can be easily stored for a long period of time. In the following, this invention is going to be explained in more detail using examples of practice. However, these examples of practice are for indicating the specific effects of this invention, and they do not limit the contents of this invention.

[0055]

#### Example of practice 1

30.49 g of 37 % sodium acrylate solution and 2.88 g of acrylic acid, 0.4 g of N, N-methylene bis acryl amide as cross-linking agent, and 13.83 g of water were mixed, and this solution and dimethyl formamide bacillus (*Arthrobacter bacillus*) were suspended and mixed, and a mixed solution was prepared. To this, 0.95 g of ammonium persulfate and 1 g of N, N, N', N'-tetramethyl ethylene diamine were added as polymerization promoting agents, and this prepared solution was poured into a square laboratory dish, and polymerization was started.

[0056] After it was reacted for 15 minutes, the polymer was removed from the square laboratory dish, and it was washed. Next, it was cut into 35 mm squares using a surgical knife. Next, it was transferred to a desiccators and dried overnight at room temperature under reduced pressure. By drying, the volume of the polymer was reduced down to approximately 1/20. Next, this was put into a sealed container and stored for 3 months at

room temperature. After that, part of the immobilized cells were used to inoculate a cultivation field containing dimethyl formamide.

[0057]

Table 1

Components	Concentration (/L)
Dimethyl formamide	30 g
Sodium sulfate	10 g
Ammonium sulfate	1 g
Potassium dihydrogen phosphate	2.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5 g
Magnesium sulfate	0.2 g
Sodium chloride	0.5 g
Corn steve liquor	1 g
Tap water	950 g
pH	7.0 g

[0058] As a result, the dried immobilized cells absorbed the cultivation field, and its volume swelled to approximately 30 times. When it was cultivated for 3 days, 50 % of the dimethyl formamide was decomposed. When the immobilized cells were separated from the cultivation liquid and was used to inoculate a new cultivation field, decomposing speed was increased by approximately 1.5 times. In order to check the toxicity of the acrylic acid to the microorganism, the bacillus root was suspended in an acrylic acid salt solution for a certain time, and its growth after contacting acrylic acid was observed. Growth was measured by the amount of light absorbed at 660 nm. If the light absorbing degree increased compared to the starting point, this means that the number of bacilli increased. As shown in table 2, the bacilli increased after contacting the sodium acrylate. From these results, it was understood that the toxicity of acrylic acid to the bacillus was low.

[0059]

(Example of comparison 1)

7.5 g of acryl amide, 0.4 g of N, N-methylene bis acryl amide as cross-linking agent, and 50 g of water were mixed, and this solution and dimethyl formamide bacillus (*Arthrobacter bacillus*) were suspended and mixed, and a mixed solution was prepared. To this, 0.95 g of ammonium persulfate and 1 g of N, N, N', N'-tetramethyl ethylene diamine as polymerization promoting agents were added, and this prepared solution was poured into a square laboratory dish, and polymerization was started.

[0060] After it was reacted for 15 minutes, the polymer was removed from the square laboratory dish, and it was washed. Next, it was cut into 35 mm squares using a surgical knife. After that, part of the immobilized cells were used to inoculate a cultivation field containing dimethyl formamide, and cultivation was performed. As a result of cultivation for 5 days, decomposition of dimethyl formamide was not confirmed.

[0061] In order to check the toxicity of acryl amide to the microorganism, the bacillus root was suspended in acryl amide for a certain time by a method similar to the above

example of practice, and growth after contact with acryl amide was observed. As shown in table 2, when contact was made with acryl amide, since no increase in light absorption after cultivation was confirmed, it was regarded that the bacillus did not grow. From these results, it was understood that the toxicity of acryl amide to bacillus was high.

[0062]

Table 2

Processing condition	Breeding (light absorbing degree of 660 nm)	
	0 hr	13 hr
Contrast	4.90	8.10
15 % acryl amide		
9 min. treatment	4.46	4.45
13 min. treatment	4.32	4.35
22 min. treatment	4.33	4.30
15 % acrylic acid – sodium acrylate		
9 min. treatment	4.56	7.45
13 min. treatment	4.42	7.15
22 min. treatment	4.22	6.91

[0063]

(Example of practice 2)

30 mol of a neutralized solution containing 40 wt. % of methacrylic acid was adjusted with sodium hydroxide so that its pH was 7, 0.0246 g of N, N, N', N'-methylene bis acryl amide as cross-linking agent, and 10 g of water were mixed. This solution and yeast separated from earth were suspended and mixed, and a mixed solution was prepared.

[0064] Meanwhile, in a separable 300 ml flask with an attached stirring machine, 200 ml of mixed solvent of cyclohexane and carbon tetrachloride with its relative weight adjusted to 1 was put in, and the temperature was set at 10°C. Next, it was permeated by nitrogen gas for approximately 15 minutes to remove the remaining oxygen. Next, the mixed solution was added, it was stirred at 600 rpm, and it was dispersed as liquid drops. When it was dispersed uniformly, 0.95 g of an ammonium persulfate polymerization initiator and 1 g of tetramethyl ethylene diamine polymerization promoter were added to the suspension, and polymerization was performed.

[0065] After reacting it for 15 minutes, the reaction was complete. The contents of the separable flask were put into a filter with 0.5 mm mesh, and the immobilized cells were collected. These were transferred to a desiccators, and it was dried under reduced pressure. After drying was complete, the immobilized cells were collected, and they were stored dry for 3 months. After 3 months, part of the immobilized cells were used to inoculate a Difco yeast nitrogen based medium with 1 % glucose added, and a 1 day cultivation was done. As a result, all the glucose in the cultivation field was consumed.

[0066]

(Example of practice 3)

Except that cyclohexane with 0.78 relative weight was used alone as the solvent, the same method as example of practice 2 was followed, and preparation of immobilized cells was tried. As a result, the mixed solution which contained cells was not dispersed in the upper layer of the separable flask. When this was polymerized, immobilized cells in spherical shape were not acquired. Instead, an uneven aggregate of immobilized cells in spherical shape with 10 mm or more diameter was acquired. These immobilized cells were cut into approximately 5 mm squares using a surgical knife. When they were cultivated the same as example of practice 2, decomposition of glucose was seen.

[0067]

(Example of practice 4)

Except that carbon tetrachloride with 1.63 relative weight was used alone as the solvent, the same method as example of practice 2 was followed, and preparation of immobilized cells was tried. As a result, a mixed solution which contained cells was distributed in the upper layer of the separable flask, but it was hardly dispersed in the lower layer. When this was polymerized, the upper layer was uniformly turned to gel, and it all stuck together. The immobilized cells acquired in this condition were cut into approximately 5 mm squares using a surgical knife. When the cells were cultivated the same as example of practice 3, decomposition of glucose was seen.

[0068]

(Example of practice 5)

50 ml of 20 % acrylic acid solution had its pH adjusted to 7 using sodium hydroxide. 0.4 g of methylene bis acryl amide as cross-linking agent and 10 ml of spore suspension solution of *Aspergillus terreus* IFO 6123 were added, and a mixed solution was prepared.

[0069] Meanwhile, 200 ml cyclohexane was put in a separable 300 ml flask with an attached stirring machine, and the temperature was set at 10°C. Next, it was permeated by nitrogen gas for approximately 15 minutes to remove the remaining oxygen. Next, four drops of Span 80 (sorbitane mono oleate) surfactant were added, the above mixed solution was added, it was stirred at 600 rpm, and it was dispersed as liquid drops. When it was dispersed uniformly, 1 g of an ammonium persulfate polymerization initiator and 1 g of N, N, N', N'-tetramethyl ethylene diamine polymerization promoter were added to the suspension, and polymerization was started.

[0070] After reacting for 15 minutes, the reaction was complete. The contents of the separable flask were put into a stainless steel filter with 0.5 mm mesh, and the immobilized cells were collected. The immobilized cells acquired here were spherical with a diameter of around 1 mm. Next, part of these were washed, and they were used to inoculate the cultivation field shown in table 3. After cultivation for 3 days, the cultivation field was analyzed, and 4.8 g/L of itaconic acid were generated.

[0071]

(Example of practice 6)

50 ml of 20 % acrylic acid solution was adjusted to pH 7 using sodium hydroxide, and a solution of 10 g of acryl amide, 0.4 g of methylene bis acryl amide as cross-linking

agent and 10 ml of a spore suspension solution of *Aspergillus terreus* IFO 6123 were mixed, and a mixed solution was prepared.

[0072] Meanwhile, in a 300 ml separable flask with an attached stirring machine, 200 ml of cyclohexane with 0.3 g of super fine particle silica (AEROSIL R-972; manufactured by Nippon Aerosil) was put in, and the temperature was set to 10°C. Next, it was permeated by nitrogen for approximately 15 minutes to remove the remaining oxygen. Next, the mixed solution was added, it was stirred at 600 rpm, and it was dispersed as liquid drops. When it was dispersed uniformly, 1 g of an ammonium persulfate polymerization initiator and 1 g of N, N, N',N'-tetramethyl ethylene diamine polymerization promoter were added to the suspension, and polymerization was started. [0073] After reacting for 15 minutes, the reaction was complete. The contents of the separable flask were put into a stainless steel filter with 0.5 mm mesh, and the immobilized cells were collected. These were transferred to desiccators, and they were dried under reduced pressure. After drying for one night, they were put into sealed containers and stored for 1 month at room temperature. Next, part of immobilized cells which had been dried were used to inoculate the cultivation field shown in table 3. After cultivation for 3 days, virus hyphae were growing inside and on the surface of the immobilized carrier. When the cultivation field was analyzed, 5.03 g/L of itaconic acid were generated.

[0074]

Table 3

Components	Concentration (/L)
Dimethyl formamide	30 g
Sodium sulfate	5 g
Ammonium sulfate	1 g
Potassium dihydrogen phosphate	1 g
Dipotassium hydrogen phosphate	3 g
Magnesium sulfate	0.8 g
Corn steve liquor	2 g
Vitamin B1 hydrochloride	100 µg

[0075]

(Example of practice 7)

50 ml of 30 % sodium acrylate solution was pH adjusted to 5.7 was mixed with 0.5 g of a methylene bis acryl amide cross-linking agent to make a solution. To this solution, 10 ml of distilled water containing 500 U of glucose oxidase (originated from *Aspergillus niger*) were mixed, and a mixed solution was prepared. In addition, 0.5 g of sodium alginate was added to this solution, and they were mixed well.

[0076] Meanwhile, a solution was prepared in a 1 liter beaker by adding 5 g of ammonium persulfate and 1 g of N, N, N',N'-tetramethyl ethylene diamine as polymerization promoter to 500 ml of 0.2 M calcium chloride solution. The above solution was mixed with alginic acid. Using a peristaltic pump, it was dropped down to the solution in the beaker from the top end of a hypodermic needle. After dropping was complete, it was left for 30 minutes, and an immobilized enzyme was prepared.

[0077] After immobilization was complete, the contents of the beaker were put into a stainless steel filter with 0.5 mm mesh openings, and the immobilized cells were collected. Next, part of the immobilized enzyme was used to inoculate a phosphoric acid buffer (pH 5.7) which contained 10 % glucose, and enzyme activity was measured. As a result, although the calcium alginate gel was easily destroyed under these conditions, the immobilized enzyme was stable. Activity was approximately 60 % compared to the case where immobilization was not done.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-267

(43) 公開日 平成8年(1996)1月9日

(51) Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 11/04				
11/08	C			

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平6-141571
(22) 出願日	平成6年(1994)6月23日

(71) 出願人	000004628 株式会社日本触媒 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号
(72) 発明者	仙波 尚 茨城県つくば市観音台1丁目25番12 株式 会社日本触媒筑波研究所内
(72) 発明者	阪野 公一 茨城県つくば市観音台1丁目25番12 株式 会社日本触媒筑波研究所内
(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)

(54) 【発明の名称】 固定化生体触媒

(57) 【要約】

【構成】 アクリル酸及びメタアクリル酸並びにそれらの塩から成る群から選ばれた少なくとも1種の単量体と、生物細胞及び／又は酵素とを含んで成る混合溶液を、場合によっては水に難溶又は不溶の溶剤中に懸濁分散させた後、重合せしめ、所望により乾燥することを特徴とする固定化生体触媒。

【効果】 固定化生成物中に多量の細胞並びに酵素を固定化することができ、且つ容易に粒状（球状）化することができる。本発明の固定化生体触媒は、乾燥状態で貯蔵することができ、使用に際して水性媒体、例えば培地を添加することにより、所望の生化学的反応に使用することができる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アクリル酸及びメタアクリル酸並びにそれらの塩からなる群から選ばれる少なくとも1種の単量体(A)、生物細胞及び/又は酵素、並びに水を含んで成る混合溶液(1)を重合して得られる固定化生体触媒。

【請求項2】 請求項1に記載の固定化生体触媒を乾燥させて得られる乾燥固定化生体触媒。

【請求項3】 請求項1に記載の混合溶液(1)が架橋剤を含むものである請求項1又は2に記載の固定化生体触媒。

【請求項4】 請求項1に記載の単量体(A)の混合率が、混合溶液(1)に対して10~50重量%の範囲であることを特徴とする、請求項1~3のいずれか1項に記載の固定化生体触媒。

【請求項5】 請求項1に記載の混合溶液(1)を、水に難溶又は不溶の溶剤中に懸濁分散させて重合し、球状の固定化生体触媒を得ることを特徴とする固定化生体触媒の製造方法。

【請求項6】 前記水に難溶又は不溶な溶剤の比重と、前記混合溶液(1)の比重の比が1:0.9~1:1.1の範囲になる、該水に難溶又は不溶な溶剤を用いることを特徴とする請求項5に記載の懸濁重合法による固定化生体触媒の製造方法。

【請求項7】 請求項1に記載の混合溶液(1)を、分散安定剤を添加した、水に難溶又は不溶の溶剤中に懸濁分散させて重合することを特徴とする、固定化生体触媒の製造方法。

【請求項8】 前記の分散安定剤がノニオン系界面活性剤及びポリエチレングリコールから選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする請求項7項記載の製造方法。

【請求項9】 前記の分散安定剤が無機微粒子であることを特徴とする請求項7記載の製造方法。

【請求項10】 請求項1に記載の混合溶液(1)に、固定化補助剤としてアルギン酸又はその塩を添加して重合することを特徴とする、固定化生体触媒の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、固定化生体触媒、及びその製造方法に関し、固定化担体として吸水性架橋重合体中に生物細胞並びに酵素を効率よく固定でき、かつ長期保存が可能な、新規な固定化生体触媒、及びそれらの製造方法を提唱するものである。

## 【0002】

【従来の技術】生物細胞および酵素は、その物質変換能力を利用して、各種の有用物質の製造分野や、分析分野、そして水処理分野などの多方面にわたって広く利用されている。特に、該生物細胞や酵素が種々多様の不溶性担体に固定化された固定化細胞や固定化酵素は、反応

2

効率の向上や分離精製工程の簡略化、さらには生物細胞や酵素の再利用工程の簡略化などの目的を達成するために、好適に用いることができる。なお、本発明においては、固定化細胞、固定化酵素等を固定化生体触媒と称する。

【0003】そこで、もし該固定化生体触媒を常温下、乾燥状態で長期保存し、使用時に含水させて活性を発現できる方法が構築されたならば、固定化生体触媒を軽量でコンパクトな状態で、しかも低コストでの長期保存や運搬が可能になる。さらには、乾燥状態であるので保存時の雑菌汚染の問題もなくなると期待される。

【0004】固定化細胞及び酵素(固定化生体触媒)の活性を保持したままで保存する方法としては、従来、該固定化生体触媒を緩衝液や生理食塩水などに浸漬した状態で低温(冷蔵)保存をとる必要があった。この理由として、微生物や酵素は乾燥状態でも活性を維持できるものが存在するにもかかわらず、乾燥保存すること、及び乾燥保存後に含水させて使用することが可能な固定化担体が見いだされていなかったためであると考えられる。

【0005】即ち、従来のゲル状固定化担体では、乾燥させた後に水を含ませようとしても元の大きさには復元できないという問題がある。また、無機系の担体は乾燥させても担体自身の大きさには変化がないので、乾燥しても少なくともその体積は変わらない。さらに、無機系担体はそれ自身かなりの重量があることなどから、乾燥させるだけのメリットがないなどの問題がある。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】吸水性樹脂を固定化担体として利用するという報告は、本発明者らと意図するところが異なっているが、数種の例が報告されている。しかし、それらはいずれも吸水性樹脂と微生物を接触させて固定化するという方法であり、本発明者らが提唱している、アクリル酸、メタアクリル酸及びそれらの塩からなる群から選ばれる、吸水性を示す重合体を形成する単量体と生物細胞や酵素を混合してから後に重合を行い、固定化生体触媒を調製する方法とは本質的に異なっている。

【0007】即ち、他の報告例のような、吸水性樹脂と菌体とを接触させて固定化する方法では、菌体はゲル内部に侵入しにくく、表面のみでしか固定されない。またそのように固定した菌体は溶媒(培地や反応液)の塩濃度などが変化することによって容易に遊離してしまうと考えられる。一方、本発明者がここに提唱する固定化生体触媒の調製方法では、生物細胞及び/又は酵素を固定化ゲル内部に均一に保持させることができるため、明らかに単位担体量当たりの細胞及び/又は酵素の固定量が大きくなる。従って、固定化生体触媒を用いた反応の際に、その反応速度においてはるかに優れているといえる。

【0008】また、ポリアクリルアミドを固定化担体と

3

した固定化生体触媒は広く知られている。これらは、若干の吸水性を示す。しかし、ポリアクリルアミドゲルを得るには、非常に毒性の強いアクリルアミドを単量体として使用するので、固定化に使用できる細胞及び酵素の種類がかなり限定されるという欠点がある。一方、本発明に係るアクリル酸及びメタアクリル酸並びにそれらの塩は、生物細胞及び酵素に対する毒性が、アクリルアミドに比べ非常に低い。従って格段に広い種類の生物細胞及び酵素を使用できる点において優れている。さらに、従来の吸水性樹脂を利用した固定化方法においては、固定化物の保存方法についての開示はなく、従って本発明者がここに提唱している乾燥保存という概念は新規な発想である。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、軽量コンパクトに保存が可能な固定化生体触媒の調製法及び使用方法について鋭意研究を重ねてきた。その結果、アクリル酸及びメタアクリル酸並びにそれらの塩から選ばれる単量体、生物細胞及び／又は酵素、並びに水を混合後、重合して得られる吸水性を示す固定化生体触媒は容易に脱水が可能であり、乾燥状態で保存が可能であること、さらに保存後、含水させると十分な活性を発現し、物質変換や排水処理など様々な生化学反応に利用できることを見いだした。本発明は、このような知見に基づいて完成されたものである。

【0010】以降、本発明を詳細に説明する。以降の説明において、アクリル酸及びメタアクリル酸並びにそれらの塩のうち少なくとも1種からなる単量体を単量体(A)と表現し、単量体(A)と生物細胞及び／または酵素、並びに水を混合した溶液を混合溶液(1)と表現する。

【0011】まず、本発明に係わる第一の発明としては、アクリル酸及びメタアクリル酸並びにそれらの塩からなる群から選ばれる少なくとも1種の単量体(A)、生物細胞及び／又は酵素、並びに水を含んで成る混合溶液(1)を重合して得られる吸水性を示す固定化生体触媒、または、該固定化生体触媒を長期保存に適するように乾燥させて得られる乾燥固定化生体触媒である。

【0012】本発明に係わる第二の発明としては、該固定化生体触媒の効率的な調製方法であって、上記の混合溶液(1)を、水に難溶または不溶の溶剤中に懸濁分散させて重合し、球状の固定化生体触媒を得る調製方法である。これには、該水に難溶または不溶の溶剤の比重と、混合溶液(1)の比重の比が1:0.9~1:1.1の範囲になるよう、該溶剤の比重を調整することを特徴とする調製方法、及び該溶剤に分散安定剤を添加することを特徴とする調製方法とがある。

【0013】さらに、本発明に係わる第三の発明とは、第2の発明とは別の効率的な、該固定化生体触媒の調製方法であって、上記混合溶液(1)に固定化補助剤とし

4

てアルギン酸又はその塩を添加して重合し、固定化生体触媒を得る調製方法である。アクリル酸及びメタアクリル酸並びにそれらの塩からなる群から選ばれる少なくとも1種の単量体(A)とは、アクリル酸もしくはメタアクリル酸のいずれか1種もしくは双方、又はアクリル酸もしくはメタアクリル酸の塩である単量体であり、アクリル酸もしくはメタアクリル酸の塩とは、アクリル酸もしくはメタアクリル酸と陽イオンとの結合体である。陽イオンとしては、ナトリウム、カリウムなどの金属陽イオン、アンモニウムイオンなどが例示できる。

【0014】これらの酸及び塩は単独使用又は併用することができる。混合溶液(1)中の単量体(A)の添加量は、通常10~50重量%の範囲で任意に設定が可能である。ただし、単量体含量が高まるにつれ重合反応での発熱が高まるために、生物細胞及び／又は酵素の活性に対する影響が大きくなるので、10~40重量%の範囲が好ましい。例えば、多量の生物細胞や酵素を固定しようとする場合には、添加濃度を高めに、固定する生物細胞や酵素の量が少なれば低めの添加量というように、使用方法に応じて添加濃度を調整する方が好ましい。

【0015】混合溶液(1)中に、単量体(A)とともに、単量体(A)と共重合体を形成し得る単量体(A)以外のオレフィン系不飽和カルボン酸、並びにその塩及びアミドの化合物群から選ばれる少なくとも1種又は2種以上の単量体を共存単量体として添加可能である。この方法は、得ようとする固定化生体触媒の担体の性質を変える必要がある場合にとられる。該単量体(A)以外のオレフィン系不飽和カルボン酸、並びにその塩及びアミドとは、単量体(A)以外の酸であって分子中に二重結合とカルボキシル基を有するもの、並びにその塩及びそのアミド化合物のことであって、単量体(A)以外の酸には、オレフィン系不飽和モノカルボン酸及びオレフィン系不飽和ポリカルボン酸がある。オレフィン系不飽和モノカルボン酸として、クロトン酸、イソクロトン酸、アングリカ酸、チグリン酸、セネシオ酸またはそれらの混合物を例示できる。

【0016】一方、オレフィン系不飽和ポリカルボン酸として、マレイン酸、フマル酸、イタコン酸、アコニット酸、テラコン酸、シトラコン酸、メサコン酸、グルタコン酸またはそれらの混合物を例示でき、好ましくはマレイン酸、フマル酸、イタコン酸が挙げられる。単量体(A)以外のオレフィン系不飽和カルボン酸の塩とは上記のオレフィン系不飽和カルボン酸イオンと陽イオンとの結合体であって、陽イオンとしては、ナトリウム、カリウムなどの金属陽イオン、アンモニウムイオンなどが例示できる。

【0017】さらに、オレフィン系不飽和カルボン酸のアミド化合物として、例えば、アクリルアミド、メタアクリルアミドなどを例示できる。これらの酸、並びにそ

5

の塩及びそのアミド化合物は、単独使用又は併用することができる。単量体(A)が混合溶液(1)中に10〜50重量%の範囲で添加されている場合の該共存単量体の添加量には特に制限はないが、該共存単量体の中には、アクリルアミドなどのように、生物細胞及び/又は酵素の活性に対して非常に強い毒性を示すものがあるので、該共存単量体を添加する場合には、用いる生物細胞及び/又は酵素の活性に影響を与えない範囲を選択することが望ましい。

【0018】さらに混合溶液(1)のpHは、いずれの場合にも、固定する生物細胞や酵素の活性が失われない範囲になるように調整するのが好ましい。pH調整剤としては、酸性側へ調整する場合には、硫酸、塩酸、硝酸などの無機酸、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、オレフィン系不飽和カルボン酸などの有機酸が使用でき、アルカリ性側へ調整する場合には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニアなどを使用することができる。

【0019】本発明に使用できる生物細胞及び/又は酵素は、本発明による固定化できるものであればいずれでもよい。生物細胞とは、動物細胞、植物細胞、微生物細胞のうちから選ばれるものを示し、動物細胞としては、動物の正常組織由来の細胞系例えば、ヒト胎児胚由来のW138細胞、Flow2000細胞、ヒト肝臓細胞、ヒト腎臓細胞など、また動物のガン組織由来の細胞系、例えば、ヒト子宮けいガン由来のHela細胞、ヒト乳ガン由来のMCF-7細胞、ヒト大腸ガン由来のHC84C細胞、マウスメラノーマM2R細胞など、

【0020】また、B細胞と骨髄細胞を融合し特異抗体を産生するB細胞ハイブリドーマ、T細胞と骨髄細胞を融合しリンホカインなどを産生するT細胞ハイブリドーマなどを例示でき、植物細胞としては、ニチニチソウ(*Catharanthus roseus*)、オウレン(*Coptis japonica*)、オタネニンジン(*Panax ginseng*)、キキョウ(*Platycodon grandiflorum*)などの脱分化したカルス培養細胞、毛状根、再分化させたシュート組織、ルート組織、を例示でき、

【0021】微生物細胞としては、アスペルギルス(*Aspergillus*)属、ムコール(*Mucor*)属、リゾプス(*Rhizopus*)属、ペニシリウム(*Penicillium*)属、サッカロミセス(*Saccharomyces*)属、キャンデダ(*Candida*)属、シゾサッカロミセス(*Schizosaccharomyces*)属などの真菌類、エシェリヒア(*Escherichia*)属、アセトバクター(*Acetobacter*)属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属、アルスロバクター(*Arthrobacter*)属、メチロコッカス(*Methylococcus*)属、バシルス(*Bacillus*)属、ミコバクテリウム(*Mycobacterium*)属、ノカ

6

ルディア(*Nocardia*)属、などのバクテリアを例示できる。

【0022】酵素とは動物、植物、微生物の組織及び/または細胞を処理して得られる処理物、部分的に精製した粗酵素、精製酵素、該組織及び/または細胞を培養して得られる培養液から獲得できる培養液、粗酵素、精製酵素などを示し、グルコースオキシダーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ、アスパルターゼ、リパーゼ、ペルオキシダーゼなどを例示できる。

10 【0023】上記の細胞及び/又は酵素を固定化する場合、生物細胞及び/又は酵素の添加量は、混合溶液(1)中に乾燥重量で6重量%を超えない範囲で添加することが好ましい。

【0024】生物細胞及び/又は酵素の添加量が少ない場合には固定化に際し問題は生じないが、6重量%を超えて添加する場合、固定されない生物細胞及び/又は酵素の量が増大し、固定化効率が低下することがある。混合溶液(1)を調製する際、単量体(A)並びに生物細胞及び/又は酵素の添加順序は特に制限されない。例えば単量体(A)の水溶液に生物細胞及び/又は酵素を混合する方法、生物細胞及び/又は酵素の水溶液に単量体(A)を混合する方法、あるいは単量体(A)の水溶液と生物細胞及び/又は酵素の水溶液とを混合する方法など、いずれの方法でも目的の混合溶液(1)を得ることができる。混合溶液(1)を重合して吸水性を示す固定化生体触媒を得るためには、該混合溶液(1)に、架橋剤、重合開始剤及び/又は重合促進剤を添加することが好ましい。

30 【0025】該架橋剤として、例えば、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、プロピレングリコール、1,4-ブタンジオール、1,5-ペンタンジオール、1,6-ヘキサンジオール、ネオペンチルグリコール、トリメチロールアロパン及びペンタエリスリトールのジアクリレートまたは、ジメタアクリレート、トリメチロールアロパン及びペンタエリスリトールのトリアクリレートまたはトリメタアクリレート、ペンタエリスリートのテトラアクリレートまたはテトラメタアクリレート、またはN,N-メチレンビスアクリルアミド、N,N-メチレンビスメタアクリルアミド、イソシアヌル酸トリアリルなどを挙げることができ、これらのうちの1種または2種以上を用いることができる。

40 【0026】該重合開始剤としては、過硫酸カリウム、過硫酸アンモニウム、過硫酸ナトリウムなどの水溶性ラジカル重合剤を例示でき、これらのうちの1種または2種以上を用いることができ、さらにこれらと亜硫酸塩、L-アスコルビン酸などを併用したレドックス系開始剤として用いることも可能である。重合促進剤の添加は必ずしも必要ではないが、よりスムーズに固定化を行うには、添加が好ましい。重合促進剤としては、N,N,

50

N', N'-テトラメチルエチレンジアミン、エチレンジアミンなどが使用できる。

【0027】以降、個々の発明に係わる反応条件について詳細に説明する。まず、本発明に係わる架橋剤の添加量は、単量体のモル数に対して調整すべきである。架橋剤の添加比率が高まると、得られる固定化物は堅く、吸水能力が低くなり、一方、添加比率が低いと固定化物は柔らかく、かつ吸水能力が高くなる。従って、固定化生体触媒の使用目的・条件に応じて架橋剤の添加量を調整することが望ましい。

【0028】通常、混合溶液(1)中の架橋剤濃度は、添加した単量体(A)のモル数に対して0.001~50モル%の比率で用いられる。架橋剤の使用量が0.001モル%未満であれば得られる固定化生体触媒は柔らかく粘着性を有するため、固定化生体触媒が互いに粘着しあって使用しにくくなる。一方、50モル%を超える場合には固定化生体触媒の吸水性が顕著に低下する。

【0029】次に、重合促進剤と重合開始剤の組成と添加条件について説明する。重合促進剤と重合開始剤とは、混合溶液(1)中に溶解させてから重合させてもよいが、後述するように、混合溶液(1)を一旦、固定化物を得るための鋳型なり、水難溶性または水不溶性の溶剤中に懸濁させてから添加してもよい。

【0030】重合促進剤は、混合溶液(1)中へ、単量体(A)の添加モル数に対して0.2~10モル%の範囲で添加するのが適当である。いずれの場合でも、0.2モル%未満の重合促進剤の添加量では重合促進剤の効果がほとんどなく、また10モル%を超えると生物細胞への影響がでやすくなるのでこの範囲での添加量が好ましい。

【0031】重合開始剤の添加量は、混合溶液(1)中へは、単量体(A)の添加モル数に対して0.005~1.0モル%の範囲が適当である。いずれの場合でも、0.005モル%以下では重合反応に多大な時間を要し、1.0モル%以上では吸水性の低い固定化生体触媒を生成する。これは混合溶液(1)を鋳型に流し込んで重合する場合でも、溶剤に懸濁させて重合させる場合でも同様である。

【0032】次に、重合反応条件について説明する。重合を円滑に行わせるためには、混合溶液(1)中の溶存酸素、及び以降に述べる溶剤中の溶存酸素をできる限り除去することが望ましく、窒素ガスの通気などが有効な方法として挙げられる。重合開始温度は、重合によって発熱が起こり、生物細胞及び/又は酵素の活性に影響がでることが考えられるので、できる限り低温で行う方が好ましい。しかしながら、生物細胞及び/又は酵素が熱に非常に安定であるならば、この限りではない。従って、重合開始時の温度は通常、0~30℃の範囲で設定することが好ましく、さらに0~25℃の範囲がより好ましい。

【0033】重合の開始と終了は重合促進剤と重合開始剤とを添加した混合溶液(1)中、もしくはこれが投入されている懸濁重合装置内の温度をモニターすることで知ることができる。即ち、重合が開始するとともに温度が上昇し、やがてその温度上昇が停止し、下降し始める。この下降し始めた時点をもって重合の完了とする。この温度変化曲線におけるピーク温度を、生物細胞及び/又は酵素の活性を損なわない程度になるよう、重合開始温度を設定するか、または除熱操作をする。以上の操作をもって固定化生体触媒を調製することができる。

【0034】こうして得られた固定化生体触媒はそのまま目的とする生化学的反応に用いることができるが、未反応成分を除去する必要がある場合には、生物細胞及び/又は酵素の活性に影響を与えない適当な緩衝液、生理食塩水、水などで洗浄してもよい。一方、得られた固定化生体触媒を保存する場合には、水分を除去するための方法が採られる。水分の除去方法は通常用いられる手法で、例えば減圧乾燥、温風乾燥、乾燥剤による乾燥、凍結乾燥など種々の方法が利用できる。乾燥が完了すれば固定化生体触媒の体積及び重量は大幅に減少する。これを回収して湿気を遮断した環境で、室温あるいは低温で保存すれば、省スペースで長期に保存が可能である。

【0035】本発明によって得られる固定化生体触媒はそれらの使用目的に応じた種々の形態及びサイズのものが調製可能である。即ち、鋳型重合法によって調製される固定化生体触媒、懸濁重合によって調製される種々のサイズの球状固定化生体触媒、そして、滴下重合によって調製される種々のサイズの球状固定化生体触媒が調製できる。

【0036】まず、鋳型重合法による固定化生体触媒の調製方法について説明する。前述の方法によって調製した混合溶液(1)を所望の鋳型容器に入れ、重合促進剤と重合開始剤を順次添加すれば重合が開始する。さらに、あらかじめ該混合溶液(1)と重合促進剤、重合開始剤を混合した溶液でも同様に重合させられる。

【0037】得られる固定化生体触媒は鋳型どおりの形状であるので、使用目的に合致したサイズもしくは形状にするには、これを破砕や切断によって成形加工すれば良い。こうして得た固定化生体触媒はそのまま目的の生化学反応に利用できる。一方、乾燥保存は、前述の乾燥方法によって、そのまま乾燥しても良く、一度洗浄を行ってから乾燥させても良い。乾燥させた固定化生体触媒は湿気を遮断した環境で長期に保存が可能である。

【0038】次に、懸濁重合法による球状の固定化生体触媒の調製方法について開示する。球状の固定化生体触媒を調製する方法として、比重を混合溶液(1)の比重に近づけた水不溶性又は水難溶性の溶媒中に該混合溶液(1)を分散懸濁して重合する方法、水不溶性又は水難溶性の溶媒の比重を調整する代わりに、分散安定剤を水不溶性又は水難溶性の溶媒中に添加して、混合溶液

(1)を分散懸濁して重合する方法とがある。

【0039】まず、比重を混合溶液(1)の比重に近づけた水不溶性又は水難溶性の溶媒中に、混合溶液(1)を分散懸濁して重合する方法について説明する。混合溶液(1)を該溶媒に懸濁すると、混合溶液(1)は球状の液滴として該溶媒中に分散する。

【0040】本発明に使用できる該溶媒として、デカン、オクタン、ヘプタン、ヘキサン、シクロヘキサン、シクロペンタン、メチルシクロペンタン、メチルシクロヘキサン、ペンタン、リグロインなどの炭化水素系有機溶剤、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸などの脂肪酸系有機溶剤、ベンゼン、トルエンなどの芳香族系有機溶剤、四塩化炭素、クロロホルム、フロンなどのハロゲン系有機溶剤を例示でき、これらの群から選ばれる1種または2種以上を用いることができる。また、重合後の該溶媒の除去を考慮して低沸点溶剤の利用がより好ましい。

【0041】混合溶液(1)と溶媒との比重を近づけて重合を行う方法について説明する。混合溶液(1)の溶媒中での液滴分散を安定にするためには、複数の上記の溶媒を混合することによって、溶媒の比重を分散させようとする混合溶液(1)の比重に近づけることが好ましい。

【0042】即ち、該溶媒の比重と、混合溶液(1)の比重の比が1:0.9~1:1.1の範囲になるよう、該溶媒の比重を調整する。溶媒との比重差が大きいと混合溶液(1)と溶媒とが上層と下層とに分離してしまい、分散が非常に不安定となるため、粒径の揃った固定化生体触媒が獲得しにくくなる。しかし比重を調整すれば、安定した分散系が得られ、ほぼ均一粒径の固定化生体触媒を得ることができる。粒径は懸濁系の攪拌によって調整する。従って、目的に応じて懸濁系の攪拌速度及び/または攪拌方法を調整することが望ましい。

【0043】こうして得た懸濁系に、重合開始剤と重合促進剤を添加すれば重合が開始する。勿論、重合開始剤と重合促進剤を混合溶液(1)に添加してから、溶媒中に懸濁しても同様の重合が可能である。混合溶液(1)の溶媒中への添加量は、通常、10~50体積%の範囲が好ましい。さらに好ましくは、30~50体積%である。この範囲以外では、分散が不十分になり目的とする球状の固定化生体触媒が得られにくくなったり、生産性が低下するなどして好ましくない。

【0044】重合の進行経過は、前述の通り、懸濁系の温度変化をモニターすることによって知り得る。こうして得られた固定化生体触媒はメッシュ及び/または篩いなどを利用して回収する。回収した固定化生体触媒をそのまま反応に用いる場合は洗浄して不要な溶媒を除くとより好ましい。次に、溶媒の比重を調整する代わりに分散安定剤を添加した溶媒中に混合溶液(1)を分散・懸濁して重合する方法について説明する。

【0045】上記の懸濁重合方法は、混合溶液(1)と水に不溶又は難溶の溶媒との比重が近づくよう、溶媒の比重を調整する方法であるが、該溶媒に分散安定剤を添加すれば比重を調整しなくても球状の固定化生体触媒を調整することができる。この方法に用いることのできる溶媒としては、上記の水に難溶又は不溶の溶剤がいずれも利用できる。この方法において添加する分散安定剤とは、混合溶液(1)の液滴が安定に存在できるように、その分散を補助する物質であり、ノニオン系界面活性剤、ポリエチレングリコール、無機微粒子がある。

【0046】ノニオン系界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェノールエーテル、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアシルエステル、ポリオキシエチレンオキシプロピレンブロック共重合体、しよ糖脂肪酸エステルなどを挙げることができる。ポリエチレングリコールとしては、広い範囲の分子量のものをを用いることができるが、400~1000000の範囲のものが好ましい。

【0047】これらのノニオン系界面活性剤及びポリエチレングリコールの中から1種又は2種以上を用いることができる。ノニオン系界面活性剤及び/またはポリエチレングリコールの添加量はこれらの種類によって異なるが、混合溶液(1)に対して0.01~20重量%が好ましい。ノニオン系界面活性剤及び/またはポリエチレングリコールの添加方法は、該溶媒中に添加して使用するが好ましい。

【0048】また、無機微粒子としては、例えば、シリカ、アルミナ、二酸化チタン、チタン酸バリウム、チタン酸マグネシウム、チタン酸カルシウム、チタン酸ストロンチウム、酸化亜鉛などがあり、なかでもAEROSIL R-972, 974, 502, 805, 812 (日本アエロジル製)などのシリカ微粒子が好適に用いられ、一次粒子径が100 $\mu$ m以下のシリカ微粒子が好ましく、表面が疎水性であるものがさらに好ましく用いられる。

【0049】該無機微粒子の添加量は混合溶液(1)の添加量及び分散液滴の径、さらには溶媒の量によって調整する。該無機微粒子の添加方法は、該溶媒中に重合操作以前に添加して使用するが好ましい。該無機微粒子は反応系に一度添加すれば通常、追添加は必要ではない。一例として、混合溶液60mlを200mlの溶媒中で重合する場合の疎水性シリカ微粒子の添加量は該溶媒に対して0.05~1%の範囲が好ましい。

【0050】これ以降の操作は、上記の懸濁重合方法と同一である。混合溶液(1)に、アルギン酸又はその塩を固定化補助剤として添加し、多価金属塩水溶液に滴下して重合して固定化生体触媒の調製方法を説明する。本調製方法は、混合溶液(1)にアルギン酸又はその塩を添加する方法であって、混合溶液(1)組成は前述の組

11

成と同一である。アルギン酸又はその塩の添加量は混合溶液(1)中の濃度が0.01~10重量%の範囲で添加できる。

【0051】混合溶液(1)とアルギン酸又はその塩を混合したならば、これを多価金属塩を含有する水溶液に滴下する。ここで用いられる多価金属塩とは、多価金属イオンとして、例えば、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、ストロンチウムイオン、バリウムイオン、銅イオン、鉄イオン、アルミニウムイオンなどを含むものを例示でき、具体例として、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、酢酸カルシウム、酢酸マグネシウム、塩化ストロンチウム、塩化銅、硝酸カルシウム、硝酸マグネシウム、塩化鉄、塩化アルミニウムなどを挙げることができる。上記多価金属塩は、通常1~5重量%程度の溶液として用いることが好ましい。

【0052】このとき重合促進剤ならびに重合開始剤はアルギン酸又はアルギン酸塩を含む混合溶液(1)と混合してから後に滴下してもよく、さらに多価金属塩水溶液中に添加しておいてもよい。多価金属塩水溶液中にアルギン酸及びその塩を含む混合溶液(1)を滴下すると、瞬時にゲル化が起こる。これはアルギン酸が多価金属塩によって架橋されることに起因する、よく知られている現象である。

【0053】この時点では単量体(A)の重合はまだ起こらないので、15分~1時間程度緩やかに攪拌しながら放置しておく。この操作によって、単量体(A)の重合も完了し、柔軟で堅牢な固定化生体触媒を調製できる。こうして調製された固定化生体触媒は、従来アルギ\*

表1 ジメチルホルムアミド含有培地組成

成分	濃度(／L)
ジメチルホルムアミド	30g
硫酸ナトリウム	10g
硫酸アンモニウム	1g
リン酸二水素カリウム	2.5g
リン酸水素二カリウム	2.5g
硫酸マグネシウム	0.2g
塩化ナトリウム	0.5g
コーンステープリカー	1g
水道水	950g
pH	7.0g

【0058】その結果、乾燥固定化細胞は培地を吸収して体積が約30倍に膨潤した。3日間培養したところ、ジメチルホルムアミドの50%が分解された。この固定化細胞を培養液から分離し、新鮮な培地に接種したところ、分解速度は約1.5倍に増大した。微生物に対するアクリル酸の毒性を調べるために、上記菌株をアクリル※50

12

\*ン酸ゲルが容易に溶解してしまうリン酸水溶液中でもゲルの崩壊がなく、安定に保持できる。

【0054】以上開示した、本発明による新規な固定化細胞並びに酵素(固定化生体触媒)は、簡便・迅速に製造が可能であり、容易に長期保存が可能である。以降実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。実施例は発明の効果をより具体的に示すものであって、発明の内容を限定するものではない。

【0055】実施例1. 単量体として37%アクリル酸ナトリウム水溶液30.49gとアクリル酸2.88g、架橋剤としてN, N-メチレンビスアクリルアミドを0.4g、水を13.83g混合した水溶液とジメチルホルムアミド資化性菌体(*Arthrobacter* 属菌)を懸濁混合して混合溶液を調製した。これに、重合開始剤として過硫酸アンモニウムを0.95g、重合促進剤としてN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン1gを添加して調製した溶液を角形シャーレにそそぎ込み重合を行った。

【0056】15分間反応させた後、重合体を角形シャーレから取り出して水洗し、3~5mm角の大きさになるよう、メスを使って切断した。次いで、これをシリカゲルを入れたデシケーターに移し、室温、減圧下で、一晚乾燥した。乾燥によって、重合体の体積は約1/20に減少した。これを密封容器に入れて3ヶ月間の室温保存を行った後、固定化細胞の一部を表1に示した、ジメチルホルムアミド含有培地に接種した。

【0057】

【表1】

※酸塩水溶液中に一定時間懸濁してアクリル酸と接触させた後の増殖を調べた。増殖は波長660nmにおける吸光度で測定した。培養開始時点に比べ吸光度が増大していれば菌体の増殖がみられたことを示す。表2に示されているように、アクリル酸ナトリウムに接触させた後にも菌体増殖がみられており、この結果から、アクリル酸の

13

菌体に対する毒性は低いことがわかった。

【0059】比較例1. 単量体としてアクリルアミドを7.5g、架橋剤としてN, N-メチレンビスアクリルアミドを0.4g、水を50g混合した水溶液とジメチルホルムアミド資化性菌体を懸濁混合して混合溶液を調製した。これに、重合開始剤として過硫酸アンモニウムを0.95g、重合促進剤としてN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン1gを添加して調製した溶液を角形シャーレにそそぎ込み重合を行った。

【0060】15min 反応させた後、重合体を角形シャーレから取り出して水洗し、3-5mm角の大きさになるよう、メスを使って切断した。得られた固定化細胞の一部を表1に示した、ジメチルホルムアミド含有培地に接\*

表2

処理条件	増殖 (660nmの吸光度)	
	0 hr	13 hr
対 照	4.90	8.10
15%アクリルアミド		
9min 処理	4.46	4.45
13min 処理	4.32	4.35
22min 処理	4.33	4.30
15%アクリル酸-アクリル酸ナトリウム		
9min 処理	4.56	7.45
13min 処理	4.42	7.15
22min 処理	4.22	6.91

【0063】実施例2. 単量体としてメタアクリル酸を40重量%含有する水溶液を水酸化ナトリウムで中和しpHを7に調整した溶液30ml、架橋剤としてN, N, N', N'-メチレンビスアクリルアミドを0.0246g、水を10g混合した水溶液と土壌から分離した酵母を懸濁混合して混合溶液を調製した。

【0064】一方、攪拌機を取り付けた300ml容のセバブルフラスコには、比重を1に調整したシクロヘキサンと四塩化炭素の混合溶剤200mlを入れて温度を10℃に設定し、約15分間、窒素ガスを通気して溶存酸素を除去した。そこへ混合溶液を添加し、600rpmで攪拌し液滴として分散させた。一様に分散したところで重合開始剤として過硫酸アンモニウムを0.95g、重合促進剤としてテトラメチルエチレンジアミン1gを懸濁系に添加して重合を行った。

【0065】15分間反応させた後、反応が完結したので、セバブルフラスコの内容物を目の開きが0.5mmの篩い上にあげ、固定化細胞を回収した。これをデシケーターに移し、減圧下で乾燥させた。乾燥が完了した後、固定化細胞を回収、乾燥下で3ヶ月保存した。3ヶ月※50

14

\*種して培養を行った。5日間培養した結果、ジメチルホルムアミドの分解は認められなかった。

【0061】微生物に対するアクリルアミドの毒性を調べるために、上記菌株を実施例1と同様の方法で、アクリルアミド水溶液中に一定時間懸濁して、アクリルアミドと接触させた後の増殖を調べた。表2に示されているように、アクリルアミドに接触させたところ、培養後の吸光度上昇がみられなかったことから、菌の増殖は起こらなかったと考えられる。この結果から、アクリルアミドの菌体に対する毒性はかなり高いことがわかった。

【0062】

【表2】

※月後固定化細胞の一部を1%グルコースを添加したDifco yeast nitrogen base mediumに接種して1日間の培養を行ったところ、培地中のグルコースがすべて消費された。

【0066】実施例3. 溶剤として比重が0.78であるシクロヘキサンを単独で用いた以外は実施例2と全く同様の方法で固定化細胞の調製を試みた。試験の結果、細胞を含む混合溶液はセバブルフラスコの上層には分散しなかった。これを重合させたところ、球状の固定化細胞は得られず、球状の固定化細胞が凝集したいびつでしかも径が10mm以上のものが得られた。この条件で得られた固定化細胞を5mm程度の大きさにメスを用いて切断した。これを用いて実施例2と同様の培養を行ったところ、グルコースの分解が見られた。

【0067】実施例4. 溶剤として比重が1.63である四塩化炭素を単独で用いた以外は実施例2と全く同様の方法で固定化細胞の調製を試みた。試験の結果、細胞を含む混合溶液はセバブルフラスコの上層に分布し、下層へはほとんど分散しなかった。これを重合させたところ、上層が均一にゲル化し、ひと固まりになってしま



15

った。この条件で得られた固定化細胞を5mm程度の大きさにメスを用いて切断した。これを用いて実施例3と同様に培養を行ったところ、グルコースの分解がみられた。

【0068】実施例5. 水酸化ナトリウムでpHを7に調整した20%アクリル酸水溶液50mlに、架橋剤としてメチレンビスアクリルアミドを0.4g、アスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) IFO6123の孢子懸濁液10mlを混合して混合溶液を調製した。

【0069】一方、攪拌機をとりつけた300ml容のセパラブルフラスコには、シクロヘキサンを200ml入れ、温度を10℃に設定し、約15分間、窒素ガスを通気して溶存酸素を除去した。ここへ界面活性剤のspan 80 (ソルビタンモノオレエート) を4滴添加した後、上記の混合溶液を添加して600rpmで攪拌し、液滴として分散させた。一様に分散したところで、重合開始剤として過硫酸アンモニウムを1g、重合促進剤としてN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンを1g添加して重合を開始した。

【0070】15分間反応させた後、反応が完結したので、セパラブルフラスコの内容物を目の開きが0.5mmのステンレス篩い上にあげ、固定化細胞を回収した。得られた固定化細胞は直径1mm前後の球状であった。この一部を水洗し、表3に示した培地に接種した。3日間の培養後、培地を分析したところ、イタコン酸が4.8g/L生成していた。

【0071】実施例6. 水酸化ナトリウムでpHを7に調\*

表3 培地組成

成分	濃度 (g/L)
グルコース	30 g
硫酸アンモニウム	5 g
リン酸二水素カリウム	1 g
リン酸水素二カリウム	3 g
硫酸マグネシウム	0.8 g
コーンステープリカー	2 g
ビタミンB1 塩酸塩	100 μg

【0075】実施例7. 単量体として、pHを5.7に調整した30%アクリル酸ナトリウム溶液50mlと、架橋剤としてN, N-メチレンビスアクリルアミドを0.5g混合した溶液を調製した。これにグルコースオキシダーゼ (アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 由来) 500Uを含む蒸留水10mlを混合して混合溶液を調製した。さらにこの溶液にアルギン酸ナトリウム0.5gを添加し、よく混合させた。

【0076】一方、1L容ビーカーには、0.2Mの塩化カルシウム水溶液500mlに、過硫酸アンモニウムを※50

16

\* 整した20%アクリル酸水溶液50mlに、アクリルアミド10g、架橋剤としてメチレンビスアクリルアミドを0.4g混合した水溶液とアスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) IFO6123の孢子懸濁液10mlを混合して混合溶液を調製した。

【0072】一方、攪拌機を取り付けた300ml容のセパラブルフラスコには、0.3gの超微粒子シリカ (AEROSIL R-972; 日本アエロジル製) を添加したシクロヘキサン200mlを入れて温度を10℃に設定し、約15分間、窒素ガスを通気して溶存酸素を除去した。そこへ混合溶液を添加し、600rpmで攪拌し液滴として分散させた。一様に分散したところで重合開始剤として過硫酸アンモニウムを1g、重合促進剤としてN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン1gを懸濁系に添加して重合を行った。

【0073】15分反応させた後、反応が完結したので、セパラブルフラスコの内容物を目の開きが0.5mmのステンレス篩い上にあげ、固定化細胞を回収した。これをデシケーターに移し、減圧下で乾燥させた。一晩の乾燥後、密封容器に入れて1ヶ月間の室温保存を行った。次いで乾燥固定化細胞の一部を表3に示した培地に接種した。3日間の培養の結果、菌糸が固定化担体内部及び表面に生育した。培地を分析したところ、イタコン酸が5.03g/L生成していた。

【0074】

【表3】

※5g、重合促進剤としてN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン1gを添加した溶液を調製した。混合溶液にアルギン酸と混合し、ペリスタポンプを用い、注射針の先端からビーカー中の上記水溶液に滴下した。滴下完了後さらに30分放置して固定化酵素を調製した。

【0077】固定化終了後ビーカーの内容物を目の開きが0.5mmのステンレス篩い上にあげ、固定化酵素を回収した。固定化酵素の一部を10%グルコースを含むリン酸緩衝液 (pH5.7) に接種して、酵素活性を測定し

17

た。この条件ではアルギン酸カルシウムゲルは容易に崩壊してしまうが、ここで調製した固定化酵素は安定に保

18

持された。活性は固定化しなかった場合の約60%が発現した。